

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

STIC-ILL

386,989^{NO}

From: Canella, Karen
Sent: Tuesday, March 05, 2002 6:31 PM
To: STIC-ILL
Subject: ill order 09/819,193

Art Unit 1642 Location 8E12(mail)

Telephone Number 308-8362

Application Number 09/819,193

1. Cancer Research:
1981 May, 41(5):1978-1983
1988 Apr 1, 48(7):1864-1873
2. Anticancer Research:
1987 Jul-Aug, 7(4B):781-789
1997, Vol. 17, No. 3C, pp. 1973-1983
3. Gynecologic Oncology:
1990 May, 37(2):188-199
1992 Jun, 45(3):273-278
1991, Vol. 42, No. 1, pp. 39-43
1982, Vol. 13, No. 2, pp. 50-57
4. Pathobiology:
1997 Jul-Aug, 65(4):177-183
1993, 61(2):67-76
1992, 60(1):33-41
5. Jikeikai Med J:
1989, 36(4):303-316
1994, 41(4):407-415
6. Sapporo Med J:
1988, 57(6):603-612
1996, 65(5):433-444
7. Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica, 1995, 74(5):330-335
8. Journal of Medicine, 1997, 28(3-4):175-190
9. Experimental and Molecular Pathology, 2000 Dec, 69(3):175-191
10. International Journal of Cancer, 15 Mar 2001, 91(6):778-782
11. Experimental Cell Research, 1992 Aug, 201(2):262-272

Thanks!

CA5
3/7

札幌医誌

札幌医誌 57 (6) 603-611 (1988)

宮 和祥

ヒト子宮頸部腺癌培養細胞株 (CAC-1) の樹立とその性状 および各種抗癌剤に対する感受性の検討

早川 修 工藤 隆一 小泉 基生
山内 修 山本 裕之 竹原 正輝
札幌医科大学産婦人科学講座 (主任 橋本正淑 教授)

Establishment and Characterization of a Cell Line Derived from Human Uterine Cervical Adenocarcinoma and Its Chemosensitivity to Anticancer Drugs

Osamu HAYAKAWA, Ryuichi KUDO, Motoiki KOIZUMI, Osamu YAMAUCHI
Hiroyuki YAMAMOTO and Masaki TAKEHARA
⁶³Department of Obstetrics and Gynecology, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. M. Hashimoto)

ABSTRACT A new cell line of a human uterine cervical adenocarcinoma, designated as CAC-1, was established from a moderately differentiated adenocarcinoma of the uterine cervix. CAC-1 was subcultivated more than 150 times during 36 month period. The population doubling time was 31 hours. The number of chromosomes in the majority of cells was hypertriploidy with a mode of 75 at passage 51. In the cytoplasm, alcian blue, PAS and CEA staining positive substances could be seen. The cells produced CA-125, hCG and TPA in cultured media. The tumor obtained from nude mice inoculated with CAC-1 cells was a moderately differentiated adenocarcinoma histologically, closely resembling the original human tumor.

CAC-1 was studied for chemosensitivity against 12 anticancer drugs by in vitro colony forming assay. In vitro sensitivity was defined as a 70% or greater inhibition of colony formation when compared to controls. Etoposide, mitomycin C and cisplatin showed sensitivity at peak plasma concentrations for 1 hour exposure. The 8 drugs, which showed sensitivity at 1/10 peak plasma concentration for 24 hour exposure, were aclacinomycin, actinomycin D, mitomycin C, etoposide, adriamycin, vincristine, vinblastine and cisplatin. (Received September 13, 1988 and accepted September 26, 1988)

Key Words: Established cell line. Uterine cervical adenocarcinoma, CA-125, Chemosensitivity, In vitro colony forming assay

1 緒 言

子宮頸部腺癌は頸癌の約 10% を占めるが、頸部扁平上皮癌に比べると natural history や細胞生物学的特性については不明な点が多い。臨床的には放射線や抗癌剤に対する感受性が低いとされているため、手術不能の進行癌や再発癌の症例に対して有効な治療法は確立されていない。頸部腺癌の診断・治療・細胞生物学的特性を検討するためには培養細胞株を用いた in vitro の

研究が必要であるが、ヒト子宮頸部腺癌培養細胞株は HeLa¹⁾, OMC-4²⁾ の 2 株が報告されているに過ぎない。

今回著者は CA-125, human chorionic gonadotropin (hCG), tissue polypeptide antigen (TPA) を産生する中等分化型内頸部型子宮頸部腺癌培養細胞株 (CAC-1: cervical adenocarcinoma) の樹立に成功し、その樹立経過と細胞生物学的性状および各種抗癌剤に対する感受性を検討したので報告する。

2 実験方法

2-1 培養材料

症例は1985年7月5日に子宮頸部腺癌 IIb 期の診断で広汎性子宮全摘除術を施行された32歳の婦人である。培養材料は摘出された子宮頸部原発癌から採取した。摘出物の組織学的診断は中等度分化型内頸部型腺癌であった (Fig. 1)。粘液染色はalcian blue, diastase 消化後 PAS 染色とともに陽性で, peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法による carcinoembryonic antigen (CEA: DAKO 社) の酵素抗体法染色も陽性であった。



Fig. 1 Histology of the original tumor revealed moderately differentiated adenocarcinoma (endocervical type) of the uterine cervix. (hematoxylin-eosin stain $\times 95$)

2-2 培養方法

採取した腫瘍組織を細切し, dispase type II (合同酒精) 1000 PU/ml で30分間の酵素処理後に数回の遠沈を繰返して細胞を集めた。沈澱を培養液で再浮遊させて60 mm 径 plastic dish (Corning 社) に 5×10^5 個の生細胞を植込み, $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ の条件下で静置培養した。培養液は Eagle's minimal essential medium (MEM: ニッスイ) に penicilline 100 U/ml・streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (GIBCO 社) と牛胎仔血清 (FBS: GIBCO 社) を20%濃度で添加したものを使用した。継代培養は0.25% trypsin (GIBCO 社) と0.02% EDTA を併用して細胞を剥離し, 1:2 または1:4 split で行った。

2-3 形態学的観察

培養細胞は Papanicolaou 染色と alcian blue, diastase 消化後 PAS の粘液染色, PAP 法による CEA 酵素抗体法染色を行い顕微鏡で観察するとともに, 電顕による観察は草薙ら³⁾の方法に従って透過型電顕 (TEM) および走査型電顕 (SEM) で観察した。

2-4 培養細胞の性状

継代16, 29, 50代目の 1×10^5 個の単離生細胞を35 mm 径 plastic dish (Corning 社) に植込んだ。培養液交換を隔日に行いながら連日2 dishes の細胞数を算定して増殖曲線を作成し, 倍加時間と細胞飽和密度を求めた。コロニー形成率は60 mm 径 plastic dish に各々 1×10^2 , 5×10^4 , 1×10^5 個の単離生細胞を植込み, 2週間後にギムザ染色を行い肉眼で確認し得る平均コロニー数と植込み細胞数との比で示した。

2-5 染色体分析

著者らが報告した方法⁴⁾で行った。継代14, 51代目の培養細胞をカバーガラス上に増殖させた。対数増殖期に入る頃に colcemid (SIGMA 社) を $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 濃度で4時間作用させた後に0.2% KCl 溶液にて低張処理を行った。続いて酢酸アルコール (氷酢酸1容: メタノール3容) で固定後ギムザ染色を行った。各世代とも100個以上の分裂中期細胞を観察して染色体数を分析した。核型分析は trypsin 処理による G-band 法で行った。

2-6 異種移植

継代17, 45代目の 1×10^7 個の培養細胞を6週齢の BALB/c 系ヌードマウスの背部皮下に接種し異種移植性を検討した。

2-7 培養液中に放出される腫瘍マーカーの測定とS期細胞の同定

継代20代目の 1×10^5 個の単離生細胞を35 mm 径 plastic dish に植込み増殖曲線を作成しながら対数増殖期と定常期で48時間あたりに培養液中に放出された各種腫瘍マーカーを radioimmunoassay で測定した。測定した腫瘍マーカーは α -fetoprotein (AFP), CEA, hCG, TPA, CA-125, CA-19.9 の6種類である。

S期細胞の同定は腫瘍マーカーを測定する時期にあわせてカバーガラス上に増殖させた培養細胞に培養液で溶解した5-bromodeoxyuridine (BrdU: SIGMA 社) 10 μM と30分間接触させた。続いて95%エタノールで固定し, 4 N 塩酸で30分間処理後十分に洗浄して抗 BrdU 抗体 (Bekton Dickinson 社) を用いて avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法にて酵素抗体法染色を行った。各標本ごとに3000個以上の細胞をカウントして対数増殖期と定常期におけるS期細胞の割合を算出した。

2-8 抗癌剤感受性試験

抗癌剤感受性の検討はコロニー形成法による北野ら⁵⁾の microcolonies inhibition test に準じて行った。方法は24 well multidish (Nunc 社) に継代53, 55代目の単離生細胞を 1×10^3 個/well で植込み, 対数増殖期

細胞を 35
んだ。培養
細胞数を算
飽和密度を
lic dish に
包を植込み
る平均コロ

14, 51 代目
対数増殖
 $\times 10^{-7}$ M 濃
にて低張処
酸 1 容:メ
た。各世代
染色体数を
G-band 法で

を 6 週齢の
重し異種移植

測定と S 期

を 35 mm 径
がら対数増殖
放出された各
測定した。測
AFP), CEA,
重類である。
る時期にあわ
胞に培養液で
SIGMA 社)
6 エタノールで
に洗浄して抗
用いて avidin-
酵素抗体法
の細胞をカウ
期細胞の割合

による北野ら⁴⁾
て行った。方
53, 55 代目
対数増殖期

に入る培養 3 日目に各種抗癌剤と接触させた。続いて抗癌剤を除去するためにリン酸緩衝液で 3 回洗い、抗癌剤を含まない培養液を用いて培養を継続した。そして約 1 週間後に抗癌剤未添加のコントロールのコロニーが 8 細胞以上になっていることを確認した上でギムザ染色を行った。各々の well のコロニー数を算定しコントロールのコロニー数と比較した。実験はすべて duplicate で行い、継代 53 および 55 代目の細胞を使用して 2 回検討した (Fig. 2)。

感受性を検討した抗癌剤は 5-fluorouracil (5 FU: 協和発酵), methotrexate (MTX: レダリー), bleomycin (BLM: 日本化薬), vincristine (VCR: 塩野義), vinblastine (VLB: 塩野義), etoposide (VP-16: 日本化薬), cisplatin (CDDP: 日本化薬), adriamycin (ADM: 協和発酵), aclacinomycin (ACM: 山之内), actinomycin D (ACD: メルク), mitomycin C (MMC: 協和発酵), cyclophosphamide の活性型である 4-hydroperoxy cyclophosphamide (40487 S: 塩野義) の 12 剤の原末を所定の溶解液を用いてストック溶液とし、処理直前に各種最終濃度に培養液で希釈した。40487 S は添加する度ごとに新たに原末を溶解して使用した。

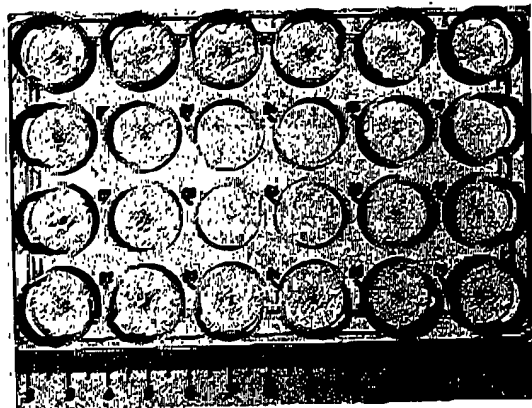


Fig. 2 In vitro chemosensitivity test by microcolonies inhibition test.

In vitro における至適な抗癌剤の添加濃度と接触時間を検討するために、今回の実験では接触時間を 1 時間と 24 時間の 2 群に分け、添加濃度は報告されている各々の抗癌剤の臨床使用量での最高血漿濃度^{5,6)}を基準として、1 時間接触群では最高血漿濃度相当とその 1/2 濃度と 1/10 濃度の 3 濃度で、24 時間接触群では 1/2, 1/10, 1/50 濃度の 3 濃度に設定した (Table 1)。

Table 1 The highest drug concentration used in the *in vitro* chemosensitivity tests. Drug concentrations were selected on the basis of the known peak plasma levels in human pharmacokinetic studies.

| drugs | $\mu\text{g/ml}$ | | $\mu\text{g/ml}$ |
|-----------------------|------------------|----------------------------|------------------|
| 5-Fluorouracil (5 FU) | 10.0 | Cisplatin (CDDP) | 2.0 |
| Methotrexate (MTX) | 3.0 | Adriamycin (ADM) | 0.4 |
| Bleomycin (BLM) | 2.0 | Aclacinomycin (ACM) | 0.6 |
| Vincristine (VCR) | 0.1 | Actinomycin D (ACD) | 0.1 |
| Vinblastine (VLB) | 0.1 | Mitomycin C (MMC) | 1.0 |
| Etoposide (VP-16) | 30.0 | Cyclophosphamide (40487 S) | 3.0 |

3 成績

3-1 細胞株の樹立経過

1985 年 7 月 5 日に初代培養を行った。初代培養では fibroblast の混入があり癌細胞の増殖は緩慢であったが、その後 fibroblast の上に重積して癌細胞が活発な増殖を始めたため colonial cloning を行い比較的容易に癌細胞の純培養系を得た。以後安定した増殖を続けており 36 か月間に 150 回以上の継代に成功している。また、マイコプラズマの汚染についてはマイコプラズマ染色キット (大日本製薬) を用いて定期的に調べているが検出されていない。

3-2 細胞形態

培養細胞は円錐状あるいは多角形で N/C 比が高く、敷石状に増殖するが容易に重積する (Fig. 3)。細胞質はレース状で原腫瘍と同じく alcian blue, diastase 消化後 PAS 染色陽性で、CEA は約 5% の細胞で陽性であった (Fig. 4)。

TEM では核は核膜の不整変入とヘテロクロマチンの凝集が観察され、細胞質にはミトコンドリアが豊富で所々に



Fig. 3 CAC-1 cells were polygonal and columnar in shape and revealed neoplastic and pleomorphic features. (Papanicolaou stain $\times 190$)

Golgi 野が発達しており近傍に分泌顆粒を認めた。隣接する細胞間には desmosome 結合が認められ、microvilli が突出した小腺腔の形成が観察された。これらの観察所見は原腫瘍の TEM 像と類似していた (Fig. 5, 6, 7)。

SEM では細胞は相互に重積しており表面は大小不同の microvilli で覆われていた。核の存在する部分で細胞表面が隆起している所見が観察された (Fig. 8)。

3.3 細胞株の性状

継代 16, 29, 50 代目の培養細胞の増殖動態はほぼ同じで培養後約 48 時間の lag phase を経て対数増殖期に入り、培養 8 日目にはほぼ定常期に達した (Fig. 9)。29 代目では増殖曲線から算出した倍加時間は約 31 時間で、細胞飽和密度は 3.1×10^5 cells/cm²、コロニー形成率は 68% であった。

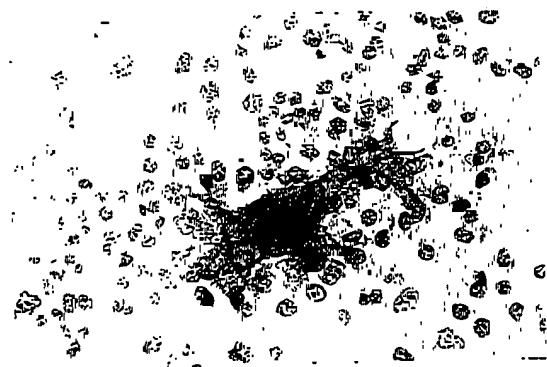


Fig. 4 CAC-1 cells were CEA positive by immunoperoxidase staining. (PAP method $\times 190$)

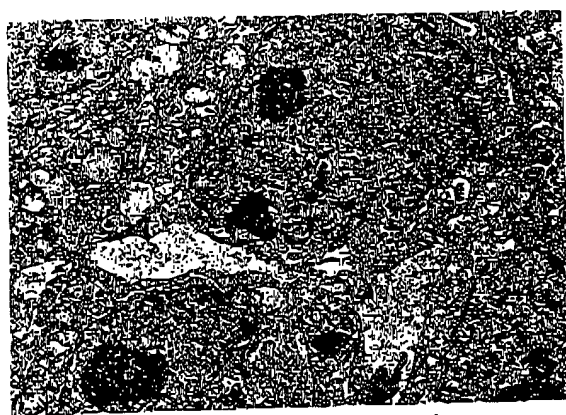


Fig. 5, 6 Transmission electron micrograph of the original tumor. ($\times 3600$), ($\times 3600$)

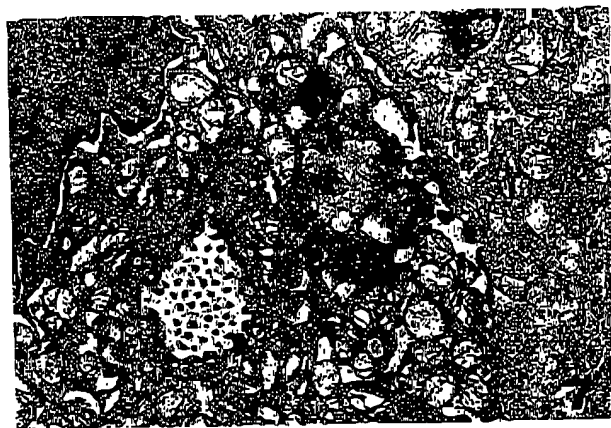


Fig. 7 Transmission electron micrograph of CAC-1 cells. The cytoplasm contained secretory granules and Golgi apparatus. The adjacent cells were linked by desmosomal junctions. ($\times 5400$)



Fig. 8 Scanning electron micrograph of CAC-1 cells. ($\times 2000$)

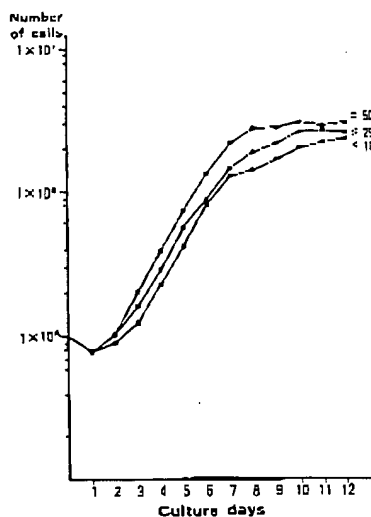


Fig. 9 Growth curves of CAC-1 at passage 16, 29 and 50.

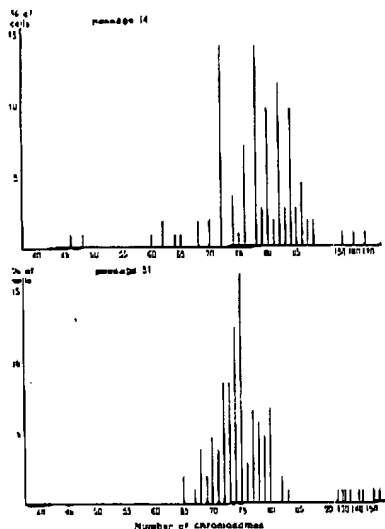


Fig. 10 Distribution of the chromosomal number in CAC-1 at passage 14 and 51.

3.4 染色体分析

染色体は継代 14 代目でモードが 72 および 78 本で高 3 倍体から低 4 倍体領域に分布していたが、51 代目ではモードが 75 本で高 3 倍体領域に集中していた (Fig. 10). 核型分析では submetacentric と acrocentric のマーカー染色体が認められた (Fig. 11). 継代による染色体数分布の変化は少なかった.

3.5 異種移植

移植は継代 17 代目で約 2 か月後、45 代目で約 1 か

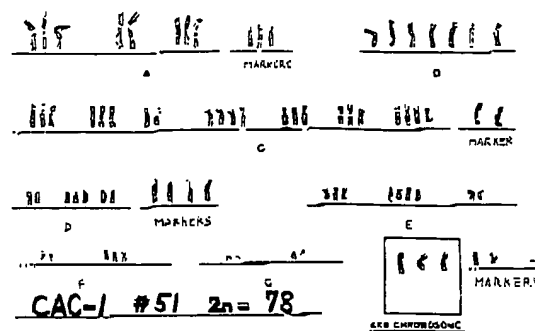


Fig. 11 G-band karyotype of CAC-1 cell at passage 51, with 78 chromosomes.



Fig. 12 Histology of the tumor produced by heterotransplantation of CAC-1 cells revealed moderately differentiated adenocarcinoma and resembled the original tumor. (hematoxylin-eosin stain $\times 95$)

月後にヌードマウス背部皮下に直径 1.5 cm の腫瘍を形成した。腫瘍は原腫瘍と同じく alcian blue, diastase 消化後 PAS 染色および CEA 酵素抗体法染色陽性の中等分化型腺癌であった (Fig. 12).

3.6 培養液中に放出される腫瘍マーカーの測定と S 期細胞の同定

コントロールとして使用した培養液中の腫瘍マーカーを測定したが、すべて測定感度以下であった。継代 20 代目で培養液中に腫瘍マーカーの放出が認められたのは、CA-125, hCG, TPA の 3 種類であった。hCG と TPA は対数増殖期で細胞 1×10^5 個あたり、それぞれ 3.1 mIU/48 h, 139.7 U/48 h であり、定常期で 1.3 mIU/48 h, 123.2 U/48 h に減少した。CA-125 はそれぞれ 7.2 U/48 h, 10.1 U/48 h で hCG, TPA とは逆に定常期で増加した。他の腫瘍マーカーはコントロールと同様に測定感度以下であった (Table 2).

また、これと同時に BrdU を用いて S 期細胞の割合を算出したが、対数増殖期で 36.2%, 定常期で 27.3% であった。

y immunoper-
 $\times 190$)



1)



micrograph of
10)

Table 2 The number of tumor markers produced in 2 days by 1×10^5 CAC-1 cells and % S phase population.

| | | control | exponential phase | stationary phase |
|----------------------|----------|---------|-------------------|------------------|
| AFP | (ng/ml) | < 5.0 | < 5.0 | < 5.0 |
| CEA | (ng/ml) | < 1.0 | < 1.0 | < 1.0 |
| hCG | (mIU/ml) | < 4 | 3.1 | 1.3 |
| TPA | (U/l) | < 30.0 | 139.7 | 123.2 |
| CA-125 | (U/ml) | < 8 | 7.2 | 10.1 |
| CA-19-9 | (U/ml) | < 5 | < 5 | < 5 |
| % S phase population | | | 36.2 | 27.3 |

3-7 抗癌剤感受性試験

継代 53 代目および 55 代目の培養細胞を使って 2 回実験したが、感受性にはほとんど差が認められなかったため、この 2 回の実験の平均値を求めて各々の感受性とした。

1 時間接触群でコロニー形成を 90% 以上抑制した抗癌剤は最高血漿濃度相当およびその 1/2 濃度で VP-16 と MMC の 2 剤が、CDDP が最高血漿濃度で 70% 以上の抑制を示した (Fig. 13)。

24 時間接触群では各抗癌剤ともに 1 時間接触群よりコロニー形成は強く抑制された。90% 以上の抑制を示したのは最高血漿濃度の 1/2 で ACD, ACM, VP-16, CDDP, MMC, ADM, VCR, 1/10 濃度で ACD, ACM, MMC, ADM, VP-16, 1/50 濃度で MMC で

あった。他に 70% 以上の抑制を示したのは 1/2 濃度で VLB, 1/10 濃度で VCR, VLB, CDDP, 1/50 濃度で VLB であった (Fig. 13)。

4 考 察

これまでヒト子宮頸癌由来の培養細胞株は多数報告されているがほとんどが扁平上皮癌由来であり、腺癌由来株は HeLa, OMC-4 の 2 株の報告があるに過ぎない。1952 年に Gey が報告した HeLa 株は長い間子宮頸部扁平上皮癌由来株と信じられ使用されてきたが、1971 年に Jonen *et al.*⁸⁾ の報告により頸部腺癌由来株であったことが判明した。HeLa 株は有用な株ではあるが樹立後 35 年以上も経過しており、現在原腫瘍の性格をどの程度保持しているか疑問が残る。頸部腺癌の細胞生物学的特性を *in vitro* で研究するためには由来が明確で原腫瘍の性格をしっかりと保持している細胞株を使用することが必要である。

Yamada *et al.* が樹立した OMC-4 株はマウス移植腫瘍から細胞培養を行い得られた分化型頸部腺癌由来株である²⁾。マウス移植腫瘍を経由して得られた細胞株の場合、マウス由来の細胞やウィルスが混入する危険性がある。今回筆者らが樹立した CAC-1 株は原腫瘍を直接 *in vitro* で培養して得られた細胞株であり、ヒト以外の細胞が混入する可能性はない。また、当教室では HeLa 株を取り扱ったことがないので混入する危険性もない。

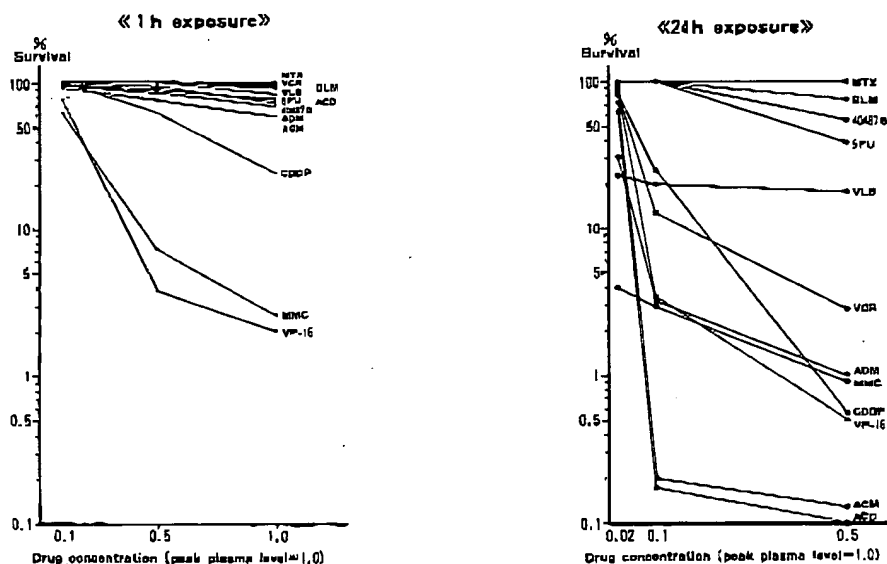


Fig. 13 Survival curves for CAC-1 cells exposed to anticancer drugs at various concentrations for 1 hour and 24 hours.

は1/2濃度で
P, 1/50濃度

株は多数報告
であり、腺癌
があるに過ぎな
い長い間子宮頸
癌きたが、1971
5由来株であっ
てはあるが樹立
の性格をどの
癌の細胞生物
由来が明確で
細胞株を使用

はモードマウ
分化型頭部腺
癌を経由して得
たウイルスが
立したCAC-1
株は細胞株
性はない。ま
とがないので

一般に患者からの摘出組織を用いた初代培養では癌細胞の他に上皮性および非上皮性の正常細胞がしばしば混在する。特にfibroblastの混在が細胞株樹立に際して問題となるが、今回はpunch biopsyによる材料を用いて予備実験を行う機会に恵まれたため、0.25% trypsin, dispaseによる細胞分散法と組織片培養を試みた。この結果上皮性細胞の収量が多く、fibroblastの混入が最も少なかったのがdispaseであった。そのため初代培養の際にdispaseを使用した方が少量のfibroblastの混入がおこりcloningが必要となった。cloningの方法は0.25%trypsinを作用させた時にfibroblastより上皮細胞のコロニーが先に剥れやすくなる特徴を生かし、さらに経験的にfibroblastの増殖を抑制することで知られている抗生物質のcephalothin 100 $\mu\text{g/ml}$ を短期間添加することによって比較的容易に癌細胞をcloningすることができた。

今回樹立したCAC-1株が原腫瘍由来の子宮頸部腺癌株であることを要付ける結果は下記の通りである。

1) 初代培養開始後3年間経過したが増殖は安定しており、150回以上の継代に成功している。

2) 接触阻止を起こすことなく容易に重複性増殖を示し、形態学的に細胞学的悪性基準をみたす異型性を有している。

3) 超微形態学的に分泌顆粒、Golgi野、desmosome結合を認め腺上皮細胞由来であることが確認され、原腫瘍の超微形態像と類似している。

4) 染色体は異数性に幅広く分布し、高3倍体領域にモードを有する。核型分析でも異常を示しマーカー染色体が認められる。

5) 異種移植が可能で形成された腫瘍は組織学的に原腫瘍と類似した中等度分化型腺癌であり、alcian blue, PAS, CEAに対する染色態度も同様である。

以上の結果を総合するとCAC-1株が原腫瘍の特徴を保持した子宮頸部腺癌株であることは明確である。

さらに、CAC-1株はCA-125, hCG, TPAを培養液中に産生し、細胞にCEAの局在を認めるのがユニークな特徴である。CA-125はBast *et al.*⁹⁾が開発した卵巣漿液性囊胞腺癌株を免疫して得られたモノクローナル抗体の対応抗原で、卵巣癌に特異性が高く婦人科臨床で広く利用されているが、この抗原の細胞における産生動態についてはまだ十分に解明されていない。今回CAC-1株の腫瘍マーカー産生と細胞の増殖動態との関係を調べるために対数増殖期と定常期で腫瘍マーカーを測定し、BrdUを用いてS期細胞の割合を検討した。その結果hCGとTPAはS期細胞の多い対数増殖期で

増加し、CA-125は逆に定常期で増加する傾向がみられた。TPAは分裂増殖の活発な細胞の細胞膜、粗面小胞体に存在し分泌されると考えられており¹⁰⁾、S期細胞の増加および細胞周期との関連性が示唆された。CA-125については卵巣漿液性囊胞腺癌株のHTOA¹¹⁾、SHIN-3¹²⁾を用いて検討した報告があり、培養開始直後のlag phaseで増加、対数増殖期で減少、定常期で再度増加しており、臓器は異なるが今回の実験結果と同様であった。しかし、CEAなどの他の腫瘍マーカーの産生では分化度や組織型あるいは個々の細胞株によって産生態度が異なるとの報告もあるため^{13,14)}、今後さらに詳細な検討が必要である。

一方、CAC-1株は細胞にCEAの局在を認めるが培養液中には検出されなかった。この理由の一つはCAC-1株のCEA陽性細胞が約5%で少ないこと。もう一つは原腫瘍の約20%がCEA陽性であったが患者血清中にはCEAが検出されておらず、CEA非分泌型の可能性が考えられる。なお、CAC-1株のCEA陽性細胞の割合は長期間継代した現在でもほとんど変化していない。著者らが以前樹立した卵巣ムチン性囊胞腺癌株(OMC-1)¹⁵⁾は培養液中に多量のCEAを産生するが、この患者血清中のCEAは高値であった。CEAの合成、分泌の機序を研究するためにOMC-1株は分泌型、CAC-1株は非分泌型として利用できる可能性があり、今後腫瘍マーカーの産生機序を研究するために貴重な培養細胞株であると考えられる。

*In vitro*の抗癌剤感受性試験はHamburger and Salmon¹⁶⁾のhuman tumor clonogenic assay (HTCA)が主流であるが、今回の検討はコロニー形成率の高い培養細胞株であるためHTCAとはほぼ同様にreproductive deathを判定できる方法として知られているPuck and Marcus¹⁷⁾のコロニー形成法の原理を用いた。さらに多数の薬剤および濃度で検討可能で、しかも簡便で安価な方法である北野ら⁵⁾のmicrocolonies inhibition testに準じて実験を行った。北野らの原法と異なる所は次の点である。

1) 原法は96 well microplateを使用しているが、底面積が小さくコロニーが相互に癒合しやすいため、底面積の広い24 well multidishを用いた。

2) 原法では培養細胞の植込みと同時に抗癌剤を添加しているが酵素処理で細胞が傷害を受けている可能性がある。そこで培養細胞がwellに付着し活発な増殖を示す対数増殖期に入る培養3日目に抗癌剤を添加した。

3) 抗癌剤との接触時間は原法では72~216時間

あるが、抗癌剤の時間依存性を考慮して1時間と24時間の2群に分け比較した。

抗癌剤との接触時間については従来のHTCAの1時間接触だけではcycle-phase specificな時間依存性の強い薬剤の効果が過小評価される危険性が高く、最近では最高血漿濃度相当あるいはその1/10濃度の持続接触で検討した報告がみられる¹⁹⁾。使用する抗癌剤の濃度、接触時間については*in vivo*の血中濃度、組織内濃度のpharmacokineticsの問題があるため統一した基準は確立されていないが、HTCAによる多数の報告では最高血漿濃度の1/10、1時間接触、70%以上のコロニー形成阻止という条件において、臨床効果との相関がtrue positive 約60%、true negative 約90%とのデータが集積されている^{6,19)}。ここで今回のCAC-1株の抗癌剤感受性について検討すると、コロニー形成阻止率70%以上を感受性ありと判定すれば、1時間接触群では最高血漿濃度でVP-16, MMC, CDDPが、1/2濃度でVP-16, MMCが感受性のある薬剤と評価されるが、1/10濃度で判定する従来のHTCAの基準では感受性のある薬剤はひとつもないことになる。24時間接触群では1/2濃度でACD, ACM, VP-16, CDDP, MMC, ADM, VCR, VLB。1/10濃度でACD, ACM, MMC, ADM, VP-16, VCR, VLB, CDDP。1/50濃度でMMC, VLBが感受性のある薬剤と評価される。1時間および24時間接触群とを比較するとVCR, VLBのcycle-phase specificな薬剤では1時間では感受性なしたが24時間では感受性ありと判定され、またcycle nonspecificな薬剤であるACD, ACM, ADMでも同様な結果を示している。接触時間を長くすれば有効濃度が低下するのは一般的な原則であるが、*in vitro*で抗癌剤感受性を調べる際に短時間接触の条件のみで効果を判定するとcycle-phase specificな薬剤は過小評価されてしまう危険性が高いことは今回の実験からも示唆された。今後は臨床使用量での各抗癌剤のpharmacokineticsを検討し、*in vitro*での抗癌剤感受性の実験条件を*in vivo*の血中、組織内濃度とその作用時間に類似した条件を確立していくことが必要であろう。

CAC-1株の抗癌剤感受性の結果はあくまでもひとつの培養細胞株に対する結果であり、これがすべての子宮頸部腺癌にあてはまるとは考えられないが、培養細胞株を用いた抗癌剤感受性試験は少なくとも癌の腫瘍別、組織型別の抗癌剤感受性スペクトラムを知る上で意義があると考えられる。子宮頸部腺癌は臨床的に抗癌剤や放射線に対する感受性が低く、手術不能の進行癌や再発癌症例に化学療法を行う場合どのような抗癌

剤を使用すべきか未だに明確な基準がない。子宮頸部腺癌培養細胞株の樹立数が極めて少ないこと、その抗癌剤感受性についてはほとんど検討されていないことを考えると、今回樹立したCAC-1株の抗癌剤感受性を検討した結果は価値のあるものと考えられる。さらに著者らはその後樹立された2つの内頸部型子宮頸部腺癌培養細胞株(OMC-4, TMCC-1)についても抗癌剤感受性試験を行ったが、MMC, VP-16, ACM, ADM, ACDに共通の感受性が示され、今後これらの薬剤の臨床での効果が期待される²⁰⁾。

また、子宮頸部腺癌に特異性の高い腫瘍マーカーは現在まで開発されておらず、CAC-1株を免疫原とした新たなモノクローナル抗体を作製し、診断・治療への応用も検討中である。今回樹立したCAC-1株は数少ないヒト子宮頸部腺癌培養細胞株のひとつとして貴重だけでなく、腫瘍マーカー産生能を有し、今後抗癌剤や放射線感受性の研究をはじめとして、腫瘍マーカーの産生機序、モノクローナル抗体の作製など種々の基礎的・臨床的研究に貢献できる有用な細胞株であると考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導・御校閲を賜りました恩師橋本正淑教授に深甚なる謝意を表わすとともに、本研究において染色体核型分析、腫瘍マーカーの測定に御協力いただいたシオノギバイオメディカルラボラトリーおよび大塚アッセイ研究所の皆様にも感謝いたします。

本論文の要旨は第25回日本臨床細胞学会秋期大会、第39回日本産科婦人科学会総会において発表した。

文 献

1. Gey, G. O., Coffman, W. D. and Kubicek, M. T.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12, 264-265 (1952).
2. Yamada, T., Ueda, M., Maeda, T., Miyawaki, Y., Misaki, O., Ueki, M. and Sugimoto, O.: Establishment and characterization of a cell line (OMC-4) originating from a human adenocarcinoma of the uterine cervix. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.* 39, 859-860 (1987).
3. 草薙鉄也, 松浦正裕, 工藤隆一: ヒト正常子宮頸部培養細胞の形態学および組織化学的観察. *日産婦誌* 32, 1907-1916 (1981).
4. 早川 修, 草薙鉄也, 工藤隆一: ヒト子宮頸部正常および異常上皮培養細胞の核DNA量並びに染色体数の検討. *日産婦誌* 37, 229-236 (1985).

札幌医誌

57 (6)1988

ヒト子宮頸部腺癌培養細胞株の樹立とその抗癌剤感受性の検討

611

5. 北野可久, 長瀬千秋: 培養人癌細胞を用いた感受性テスト—Microcolonies inhibition test を中心に—, 癌と化学療法 9, 590-598 (1982).
6. Von Hoff, D.D., Casper, J., Bradley, E., Sandbach, J., Jones, D. and Makuch, R.: Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am. J. Med.* 70, 1027-1032 (1981).
7. Matsushima, Y., Kanzawa, F., Hoshi, A., Shimizu, E., Nomori, H., Sasaki, Y. and Saijo, N.: Time-schedule dependency of the inhibiting activity of various anticancer drugs in the clonogenic assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 14, 104-107 (1985).
8. Jones, H.W., Mc Kusick, V.A., Harper, P.S. and Wu, K.D.: The HeLa cell and reappraisal of its origin. *Obstet. Gynecol.* 38, 945-949 (1971).
9. Bast, R.C., Feeney, M., Lazarus, H., Nadler, L.M., Colovin, R.B. and Knapp, R.C.: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J. Clin. Invest.* 68, 1331-1337 (1981).
10. Björklund, B.: On the nature and clinical use of tissue polypeptide antigen (TPA). *Tumor Diagnostik* 1, 9-20 (1980).
11. 杏根 昇: 卵巣癌の細胞生物学的基礎と診断・治療への応用, 第34回日産婦学会北日本連合部会特別講演要旨 83-90 (1986).
12. 清塚辰彦, 野田恒夫, 丸山雅代, 森山郁子, 一條元彦, 前田裕子, 今井俊介, 堀良義彦: In vitro における細胞増殖とCA-125発現の変動について, 産婦治療 56, 586 (1988).
13. 川瀬 忠: ヒト癌培養細胞株における癌胎児性抗原産生に関する研究, 新潟医学会誌 99, 762-773 (1985).
14. Shi, Z.R. and Kim, Y.S.: Subcellular distribution, synthesis, and release of carcinoembryonic antigen in cultured human colon adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 43, 4045-4049 (1983).
15. 早川 修, 津村典利, 小泉基生, 遠藤俊明, 工藤隆一: ヒト卵巣ムチン性囊胞腺癌培養細胞株(OMC-1)の樹立とその性状, 札幌医誌 55, 153-160 (1986).
16. Hamburger, A.W. and Salmon, S.E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197, 461-463 (1977).
17. Puck, T.T. and Marcus, P.I.: Action of X-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.* 103, 653-669 (1956).
18. Jones, C.A., Tsukamoto, T., O'Brien, P.C., Uhr, C.B. and Alley, M.C.: Soft agarose culture human tumour colony forming assay for drug sensitivity testing: H-thymidine incorporation vs colony counting. *Br. J. Cancer* 52, 303-310 (1985).
19. Salmon, S.E., Hamburger, A.W., Soehnlen, B., Durie, B.G.M., Alberts, D.S. and Moon, T.E.: Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N. Engl. J. Med.* 298, 1321-1327 (1978).
20. Hayakawa, O., Yamamoto, H., Yamauchi, O., Koizumi, M., Kudo, R. and Hashimoto, M.: Chemoresensitivity of human ovarian mucinous cystadenocarcinoma and cervical adenocarcinoma cell lines to anticancer drugs. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.* 40, 1325-1326 (1988).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学産婦人科学講座 早川 修

、子宮頸部
こと、その抗
ていないこと
薬剤感受性を
れる。さらに
型子宮頸部腺
いても抗癌剤
-16, ACM,
今後これらの

癌マーカーは
免疫原とした
断・治療への
-1株は数少な
として貴重な
、今後抗癌剤
腫瘍マーカー
など種々の基
胞株であると

を賜わまし
わすとともに、
ーカーの測定
ィカルラボラ
に感謝いたし

会秋期大会、
発表した。

icek, M. T.:
ative capacity
l epithelium.

, Miyawaki,
gimoto, O.:
of a cell line
an adenocar-
bst. Gynaec.

・正常子宮頸部
観察, 日産婦

・子宮頸部正常
並びに染色体数
1.